

26.10.2004

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 18 NOV 2004

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年12月24日

出願番号  
Application Number: 特願2003-428462  
[ST. 10/C]: [JP2003-428462]

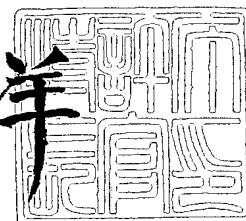
出願人  
Applicant(s): 株式会社LTTバイオフーマ

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1 (a) OR (b)

2004年10月21日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川 洋



【書類名】 特許願  
【整理番号】 LTT414  
【あて先】 特許庁長官殿  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都大田区中央 5 - 2 4 - 1 4 - 1 0 1  
    【氏名】 石原 務  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都港区六本木 6 - 1 2 - 3 - 2 4 0 2  
    【氏名】 水島 裕  
【発明者】  
    【住所又は居所】 埼玉県さいたま市南区根岸 2 - 1 6 - 2 - 2 0 9  
    【氏名】 鈴木 潤  
【発明者】  
    【住所又は居所】 埼玉県熊谷市中西 3 - 4 - 4 3 - 2 0 2  
    【氏名】 関根 準三  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県足柄上郡開成町牛島 2 7 - 1 7  
    【氏名】 山口 葉子  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県川崎市多摩区南生田 5 0 8 - 2  
    【氏名】 五十嵐 理慧  
【特許出願人】  
    【識別番号】 303010452  
    【氏名又は名称】 株式会社 L T T バイオファーマ  
【代理人】  
    【識別番号】 100083301  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 草間 攻  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 053958  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 0313604

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物を含有する一次ナノ粒子を、2 価または 3 価の金属塩と作用させることからなる薬物含有ナノ粒子。

**【請求項 2】**

脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物を含有する一次ナノ粒子を、2 価または 3 価の金属塩と作用させることにより二次ナノ粒子とし、当該二次ナノ粒子に 1 価ないし 3 価の塩基性塩を作用させることからなる薬物含有ナノ粒子。

**【請求項 3】**

一次ナノ粒子が、脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物、陰イオン残基を持つ中長鎖有機化合物および界面活性剤とを作用させることにより作製されることからなる請求項 1 または 2 に記載の薬物含有ナノ粒子。

**【請求項 4】**

陰イオン残基を持つ中長鎖有機化合物が、炭素数 6 ～ 24 の脂肪酸またはその塩である請求項 3 に記載の薬物含有ナノ粒子。

**【請求項 5】**

炭素数 6 ～ 24 の脂肪酸が、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸などの不飽和脂肪酸；ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸などの飽和脂肪酸から選択されるものである請求項 4 に記載の薬物含有ナノ粒子。

**【請求項 6】**

2 価または 3 価の金属塩が、カルシウム塩、亜鉛塩、鉄塩または銅塩である請求項 1 または 2 に記載の薬物含有ナノ粒子。

**【請求項 7】**

1 価ないし 3 価の塩基性塩が、炭酸水素塩、リン酸水素塩、炭酸塩、リン酸塩、シュウ酸塩、乳酸塩および尿酸塩から選択されるものである請求項 2 に記載の薬物含有ナノ粒子。

**【請求項 8】**

水溶性薬物の脂溶性化が、水溶性薬物と 2 価または 3 価の金属イオンとの接触、水溶性薬物と酸性または塩基性多糖体との接触、水溶性薬物を溶解した溶液の pH の調整またはイオン強度の変化のいずれかの手段により行われる請求項 1 または 2 に記載の薬物含有ナノ粒子。

**【請求項 9】**

水溶性薬物と接触させる 2 価または 3 価の金属イオンが、亜鉛イオン、カルシウムイオン、鉄イオンおよび銅イオンから選択されるものである請求項 8 に記載の薬物含有ナノ粒子。

**【請求項 10】**

界面活性剤が、ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレート (Tween80)、ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート (Tween20)、ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノステアレート (Tween60)、ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノパルミテート (Tween40)、ポリオキシエチレン (20) ソルビタントリオレート (Tween85)、ポリオキシエチレン (8) オクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン (20) コレステロールエステル、脂質-ポリエチレングリコールおよびポリオキシエチレン硬化ヒマシ油から選択されるものである請求項 3 に記載の薬物含有ナノ粒子。

**【請求項 11】**

脂溶性薬物または水溶性薬物の分子量が 1000 以下であって生理活性を有し、かつヒトに投与することができる化学物質である請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載の薬物含有ナノ粒子。

**【請求項 12】**

脂溶性薬物が、水に対して溶けにくい～ほとんど溶けないの範囲の溶解性であって、かつ有機溶媒に溶ける薬物である請求項 11 に記載の薬物含有ナノ粒子。

**【請求項 13】**

脂溶性薬物が、ステロイドホルモン、免疫抑制・調節薬、抗癌薬、抗生物質、化学療法薬、抗ウイルス薬、非ステロイド性抗炎症薬、抗精神病薬、カルシウム拮抗薬、降圧薬、プロスタグランジン系薬および脂溶性ビタミンから選択されるものである請求項 11 または 12 に記載の薬物含有ナノ粒子。

**【請求項 14】**

脂溶性薬物が、エナント酸テストステロン、プロピオン酸テストステロン、テストステロン、エストラジオール、吉草酸エストラジオール、安息香酸エストラジオール、酢酸デキサメタゾン、ベタメタゾン、ジプロピオン酸ベタメタゾン、吉草酸ベタメタゾン、酢酸プレドニゾロン、シクロスポリン、タクロリムス、パクリタキセル、塩酸イリノテカン、シスプラチン、メサトレキセート、カルモフル、デカフル、ドキシソルビシン、クラリスロマイシン、アズトレオナム、セフニジル、ナリジクス酸、オフロキサシン、ノルフロキサシン、ケトプロフェン、フルルビプロフェン、フルルビプロフェンアキセチル、クロルプロマジン、ジアゼパム、ニフェジピン、塩酸ニカルジピン、ベシル酸アムロジピン、カンデサルタンシレキセチル、アシクロビル、ビダラビン、エファビレンツ、アルプロスタジル、ジノプロストン、ビタミン A (レチノール)、ビタミン D、ビタミン E およびビタミン K から選択されるものである請求項 11～13 のいずれかに記載の薬物含有ナノ粒子。

**【請求項 15】**

水溶性薬物が、2 価または 3 価の金属イオンと結合して脂溶性化される薬物である請求項 11 に記載の薬物含有ナノ粒子。

**【請求項 16】**

水溶性薬物が、水溶性のステロイドホルモン、免疫抑制・調節薬、抗癌薬、抗生物質、化学療法薬、抗ウイルス薬、非ステロイド性抗炎症薬、抗精神病薬、降圧薬、プロスタグランジン系薬およびビタミンから選択されるものである請求項 11 または 15 に記載の薬物含有ナノ粒子。

**【請求項 17】**

水溶性薬物が、リン酸ベタメサゾン、リン酸デキサメタゾン、リン酸プレドニゾロン、コハク酸プレドニゾロン、コハク酸ヒドロコルチゾン、バンコマイシン、ビנקリスチン、ビンプラスチン、コハク酸クロラムフェニコール、ラタモキセフ、セフピロム、カルモナム、リン酸クリンダマイシンおよびアバカビルから選択されるものである請求項 11、15 または 16 のいずれかに記載の薬物含有ナノ粒子。

**【請求項 18】**

粒子の直径が 1～200 nm である請求項 1～17 のいずれかに記載の薬物含有ナノ粒子。

**【請求項 19】**

請求項 1～18 のいずれかに記載の薬物含有ナノ粒子を含有する皮膚または粘膜適用型外用剤。

**【請求項 20】**

外用剤が軟膏剤、ゲル剤、舌下錠、口腔錠剤、液剤、口腔・下気道用噴霧剤、吸引剤、懸濁剤、パップ剤および貼付剤から選択される請求項 19 に記載の外用剤。

**【請求項 21】**

請求項 1～18 のいずれかに記載の薬物含有ナノ粒子を含有する注射用剤。

**【請求項 22】**

脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物、陰イオン残基を持つ中長鎖有機化合物および界面活性剤を有機溶媒または含水有機溶媒に溶解し、この溶液を水に分散させることにより一次ナノ粒子を作製し、当該一次ナノ粒子含有溶液に 2 または 3 価の金属塩を作用させることを特徴とする薬物含有ナノ粒子の製造方法。

**【請求項 23】**

脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物、陰イオン残基を持つ中長鎖有機化合物お

よび界面活性剤を有機溶媒または含水有機溶媒に溶解し、この溶液を水に分散させることにより一次ナノ粒子を作製し、当該一次ナノ粒子含有溶液に 2 または 3 価の金属塩を作用させることにより二次ナノ粒子を作製し、当該二次ナノ粒子に 1 価ないし 3 価の塩基性塩を作用させることを特徴とする薬物含有ナノ粒子の製造方法。

【請求項 2 4】

有機溶媒が、アセトン、エタノール、プロパノールおよびブタノールから選択される 1 種または 2 種以上である請求項 2 2 または 2 3 に記載の製造方法。

【請求項 2 5】

水溶性薬物の脂溶性化が、水溶性薬物と 2 価または 3 価の金属イオンと接触させることにより行う請求項 2 2 または 2 3 に記載の製造方法。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】薬物を含有するナノ粒子およびその製造方法、ならびに当該ナノ粒子からなる非経口投与用製剤

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物を含有するナノ粒子に関し、さらに詳細には、脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物のナノ粒子およびその製造方法、ならびに当該ナノ粒子からなる皮膚および粘膜適用、ならびに注射用の非経口投与用製剤に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

薬物を経皮・経粘膜投与する目的は、経口投与剤の欠陥である、例えば、(1) 消化管からの薬物の吸収が悪く、吸収がばらつき、肝で不活性化される、(2) 急激な薬物の吸収で副作用が発現し、特に胃腸管や肝における副作用が強くなる、(3) 薬物の徐放効果が得られない、などを改善するためである。

## 【0003】

薬物の皮膚および粘膜適用に関しては、すでに多くの技術が実用化されている。それらの問題点として、局所作用を目的としたものでは皮膚・粘膜への吸収・分布が不十分であること、皮下・粘膜下組織への浸透が十分でないことなどが挙げられ、また全身への吸収を目的として用いられる場合には、全身への吸収が十分でない薬物が多いことである。

## 【0004】

さらに、薬物の全身投与を目的とした外用剤にあつては、表皮または粘膜で副作用が起きるもの、皮膚・粘膜の代謝酵素で不活性化されて副作用のある物質に変換されるものなどがあり、この場合には、薬物が表皮および粘膜で反応、代謝を受けないで、皮膚組織を通過される必要がある。たとえば、テストステロンの経皮剤は広く用いられているが、テストステロンは、皮膚に存在する 2, 5-β-ヒドロキシナーゼにより脱毛、前立腺がんを起こす活性代謝物に多く代謝されることが知られている。

## 【0005】

近年、経口投与では不活性化してしまい、注射投与を余儀なくされている生理活性タンパク質、ペプチドについて、経皮・経粘膜投与が試みられているが、吸収率の改善を確保するまでは到っていないので現状である。

## 【0006】

生理活性タンパク質の一つとして、比較的低分子で、しかも化学的に安定なインスリンを用いて皮膚、粘膜経由の投与方法について種々の研究が行われているが、その吸収率は、確実なデータでは数パーセント程度にすぎず、皮膚経由の投与ではほとんど吸収されないとされている(非特許文献1)。

## 【0007】

また、生物活性物質をカルシウム含有水難溶性無機物粒子に封入した製剤(特許文献1)、生理活性タンパク質あるいはペプチドと亜鉛イオンとの沈殿物による水不溶性徐放性組成物(特許文献2)などが提案されている。しかしながら、これらの製剤は、薬物の吸収性、あるいは局所刺激等の点で十分なものとは言えず、未だ実用化に至ったものはない。また、本発明が目的とする脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物を含有するナノ粒子を用いて皮膚、粘膜経由により生体内吸収させようとする技術については、これまで知られていない。

## 【0008】

【特許文献1】国際公開 WO 02/096396号公報

【特許文献2】特開 2003-081865号公報

【非特許文献1】DRUG DELIVERY SYSTEM 今日のDDS 薬物送達システム(医薬ジャーナル) 325~331頁、1999年

【非特許文献2】臨床薬理(Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.):26(1), p.127~12

8(1995)

【非特許文献3】Yakugaku Zasshi:121(12), p.929~948 (2001)

【非特許文献4】J. Controlled Release:79, p.81~91(2002)

【0009】

上述したように、経口投与により吸収性が悪い、あるいは不活性化する、副作用が発現するなどの欠陥を有する薬物を、皮膚、粘膜投与に適用することができ、かつ薬物の吸収性に優れ、十分な活性を発揮し、副作用を最小限にする薬剤の開発が望まれている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

したがって本発明は、経口投与によって薬効を発揮できないか、または吸収性、副作用等で欠点を有する薬物、および注射剤、皮膚外用剤として使用されているが、吸収性、副作用などの点で改善を要する薬物について、皮膚および粘膜経由の投与方法により局所も含め生体内への吸収性に優れ、高いバイオアベイラビリティを発揮し得る技術を提供することを課題とする。

【0011】

かかる課題を解決するべく、本発明者らは鋭意検討した結果、ナノテクノロジーを応用し、赤血球よりも遥かに小さい特殊なナノ粒子を利用し、それに薬物を含有させることに成功し、かくして得られたナノ粒子を、皮膚ならびに粘膜経由による投与を行った場合、ナノ粒子に含有された薬物の生体内への高い吸収性が得られ、バイオアベイラビリティに優れるものであることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0012】

本発明者らは、先に、生理活性タンパク質またはペプチドのナノ粒子を発明し、特許出願を行っている（特願2003-312031号）。本発明者らは、さらに脂溶性薬物およびタンパク質、ペプチド以外の水溶性薬物について、ナノ粒子の作製に成功し、本発明を完成させるに至った。

【課題を解決するための手段】

【0013】

したがって、本発明は、全身投与および局所投与を目的とした皮膚または粘膜投与により優れた吸収性、バイオアベイラビリティを有する、脂溶性薬物または水溶性薬物を含有するナノ粒子を提供する。また、本発明のナノ粒子は、注射用剤としても有利に使用できる。

より具体的には、本発明は、

(1) 脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物を含有する一次ナノ粒子を、2価または3価の金属塩に作用させることから成なる薬物含有ナノ粒子、

(2) 脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物を含有する一次ナノ粒子を、2価または3価の金属塩と作用させることにより二次ナノ粒子とし、当該二次ナノ粒子に1価ないし3価の塩基性塩を作用させることからなる薬物含有ナノ粒子、

(3) 一次ナノ粒子が、脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物、陰イオン残基を持つ中長鎖有機化合物および界面活性剤とを作用させることにより作製されることからなる上記(1)または(2)に記載の薬物含有ナノ粒子、

(4) 陰イオン残基を持つ中長鎖有機化合物が、炭素数6~24の脂肪酸またはその塩である上記(3)に記載の薬物含有ナノ粒子、

(5) 炭素数6~24の脂肪酸が、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸などの不飽和脂肪酸；ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸などの飽和脂肪酸から選択されるものである上記(4)に記載の薬物含有ナノ粒子、

(6) 2価または3価の金属塩が、カルシウム塩、亜鉛塩、鉄塩または銅塩である上記(1)または(2)に記載の薬物含有ナノ粒子、

(7) 1価ないし3価の塩基性塩が、炭酸水素塩、リン酸水素塩、炭酸塩、リン酸塩、シュウ酸塩、乳酸塩および尿酸塩から選択させるものである上記(2)に記載の薬物含有ナノ粒子

ノ粒子、

(8) 水溶性薬物の脂溶性化が、水溶性薬物と2価または3価の金属イオンとの接触、水溶性薬物と酸性または塩基性多糖体との接触、水溶性薬物を溶解した溶液のpHの調整またはイオン強度の変化のいずれかの手段煮より行われる上記(1)または(2)に記載の薬物含有ナノ粒子、

(9) 水溶性薬物と接触させる2価または3価の金属イオンが、亜鉛イオン、カルシウムイオン、鉄イオンおよび銅イオンでから選択されるものである上記(8)に記載の薬物含有ナノ粒子、

(10) 界面活性剤が、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレート(Tween80)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート(Tween20)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノステアレート(Tween60)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノパルミテート(Tween40)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタントリオレート(Tween85)、ポリオキシエチレン(8)オクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン(20)コレステロールエステル、脂質-ポリエチレングリコールおよびポリオキシエチレン硬化ヒマシ油から選択されるものである上記(3)に記載の薬物含有ナノ粒子、

(11) 脂溶性薬物または水溶性薬物の分子量が1000以下であって生理活性を有し、かつヒトに投与することができる化学物質である上記(1)~(10)のいずれかに記載の薬物含有ナノ粒子、

(12) 脂溶性薬物が、水に対して溶けにくい~ほとんど溶けない範囲の溶解性であって、かつ有機溶媒に溶ける薬物である上記(11)に記載の薬物含有ナノ粒子、

(13) 脂溶性薬物が、ステロイドホルモン、免疫抑制・調節薬、抗癌薬、抗生物質、化学療法薬、抗ウイルス薬、非ステロイド性抗炎症薬、抗精神病薬、カルシウム拮抗薬、降圧薬、プロスタグランジン系薬および脂溶性ビタミンから選択されるものである上記(11)または(12)に記載の薬物含有ナノ粒子、

(14) 脂溶性薬物が、エナント酸テストステロン、プロピオン酸テストステロン、テストステロン、エストラジオール、吉草酸エストラジオール、安息香酸エストラジオール、酢酸デキサメタゾン、ベタメタゾン、ジプロピオン酸ベタメタゾン、吉草酸ベタメタゾン、酢酸プレドニゾロン、シクロスポリン、タクロリムス、パクリタキセル、塩酸イリノテカン、シスプラチン、メサトレキセート、カルモフル、デカフル、ドキシソルビシン、クラリスロマイシン、アズトレオナム、セフニジル、ナリジクス酸、オフロキサシン、ノルフロキサシン、ケトプロフェン、フルルビプロフェン、フルルビプロフェンアキセチル、クロルプロマジン、ジアゼパム、ニフェジピン、塩酸ニカルジピン、ベシル酸アムロジピン、カンデサルタンシレキセチル、アシクロビル、ビダラビン、エファビレンツ、アルプロスタジル、ジノプロストン、ビタミンA(レチノール)、ビタミンD、ビタミンEおよびビタミンKから選択されるものである上記(11)~(13)のいずれかに記載の薬物含有ナノ粒子、

(15) 水溶性薬物が、2価または3価の金属イオンと結合して脂溶性化される薬物である上記(11)に記載の薬物含有ナノ粒子、

(16) 水溶性薬物が、水溶性のステロイドホルモン、免疫抑制・調節薬、抗癌薬、抗生物質、化学療法薬、抗ウイルス薬、非ステロイド性抗炎症薬、抗精神病薬、降圧薬、プロスタグランジン系薬およびビタミンから選択されるものである上記(11)または(15)に記載の薬物含有ナノ粒子、

(17) 水溶性薬物が、リン酸ベタメサゾン、リン酸デキサメタゾン、リン酸ヒドロコルチゾン、リン酸プレドニゾロン、コハク酸プレドニゾロン、コハク酸ヒドロコルチゾン、バンコマイシン、ビンクリスチン、ビンプラスチン、コハク酸クロラムフェニコール、ラタモキシセフ、セフピロム、カルモナム、リン酸クリンダマイシンおよびアバカビルから選択されるものである上記(11)、(15)または(16)のいずれかに記載の薬物含有ナノ粒子、

(18) 粒子の直径が1~150nmである上記(1)~(17)のいずれかに記載の薬



物含有ナノ粒子、  
を提供するものである。

【0014】

さらに本発明は、

(19) 上記(1)～(18)のいずれかに記載の薬物含有ナノ粒子を含有する皮膚または粘膜適用型外用剤、

(20) 外用剤が、軟膏剤、ゲル剤、舌下錠、口腔錠剤、液剤、口腔・下気道用噴霧剤、吸引剤、懸濁剤、パップ剤および貼付剤から選択される上記(19)に記載の外用剤、

(21) 上記(1)～(18)のいずれかに記載の薬物含有ナノ粒子を含有する注射用剤

(22) 脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物、陰イオン残基を持つ中長鎖有機化合物および界面活性剤を有機溶媒または含水有機溶媒に溶解し、この溶液を水に分散させることにより一次ナノ粒子を作製し、当該一次ナノ粒子含有溶液に2または3価の金属塩を作用させることを特徴とする薬物含有ナノ粒子の製造方法、

(23) 脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物、陰イオン残基を持つ中長鎖有機化合物および界面活性剤を有機溶媒または含水有機溶媒に溶解し、この溶液を水に分散させることにより一次ナノ粒子を作製し、当該一次ナノ粒子含有溶液に2または3価の金属塩を作用させることにより二次ナノ粒子を作製し、当該二次ナノ粒子に1価ないし3価の塩基性塩を作用させることを特徴とする薬物含有ナノ粒子の製造方法、

(24) 有機溶媒が、アセトン、エタノール、プロパノールおよびブタノールから選択される1種または2種以上である上記(22)または(23)に記載の製造方法、

(25) 水溶性薬物の脂溶性化が、水溶性薬物と2価または3価の金属イオンと接触させることからなる上記(22)または(23)に記載の製造方法、  
を提供するものである。

【発明の効果】

【0015】

本発明が提供するナノ粒子は、そこに含有される脂溶性薬物および水溶性薬物を、皮膚または粘膜経路により生体内吸収させるものであり、また、注射投与によっても優れた徐放性、ターゲティングを示すものである。したがって、これまで十分に達成されていなかった脂溶性薬物、水溶性薬物の経皮または経粘膜による生体内吸収を可能にする画期的な効果を有し、高吸収性、徐放性の脂溶性・水溶性薬物を含有する外用剤、注射剤が提供される。また、本発明のナノ粒子を経皮投与すると、表皮から深部まで浸透し、真皮、皮下組織に高濃度に分布し、よって皮膚に近い関節、腱鞘、筋肉などの疾患に極めて有用である。粘膜下組織に対しても同様のことがみられ、さらに種々の疾患に応用することが可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

本発明は、上記するように、脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物を含有する一次ナノ粒子を、2価または3価の金属塩を作用させることからなる薬物含有ナノ粒子(二次ナノ粒子)、および脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物を含有する一次ナノ粒子を2価または3価の金属塩と作用させることにより二次ナノ粒子とし、当該二次ナノ粒子に1価ないし3価の塩基性塩を作用させることからなる薬物含有ナノ粒子(三次ナノ粒子)、ならびにそれらのナノ粒子の製造方法、さらにそれらのナノ粒子を含有する皮膚または粘膜適用型外用剤および注射用剤である。

【0017】

本発明のナノ粒子は、その直径は1～200nm程度であり、好ましくは5～150nm程度である。かかる粒子径は、含有させる薬物と中長鎖有機化合物との配合比率、界面活性剤の添加量、1価ないし3価の塩基性塩の添加量、使用する溶媒量、攪拌の強度などによって調整することができ、直径5～500nm程度の粒子を作製することができる。また、界面活性剤の量が多くなるほど粒径は大きくなるが、少なすぎても粒子間の凝集や

大きな粒子が形成される。粒子径の測定は、光散乱法あるいは電子顕微鏡下で測定することができる。

#### 【0018】

本発明が提供するナノ粒子に含有される脂溶性薬物としては、水に対して溶けにくい～ほとんど溶けないの範囲の溶解性であって、かつ有機溶媒に溶ける薬物であればいずれでも良く、例えばステロイドホルモン、免疫抑制・調節薬、抗癌薬、抗生物質、化学療法薬、抗ウイルス薬、非ステロイド性抗炎症薬、抗精神病薬、カルシウム拮抗薬、降圧薬、プロスタグランジン系薬および脂溶性ビタミンから選択されるものである。さらに具体的にはエナント酸テストステロン、プロピオン酸テストステロン、テストステロン、エストラジオール、吉草酸エストラジオール、安息香酸エストラジオール、酢酸デキサメタゾン、ベタメタゾン、ジプロピオン酸ベタメタゾン、吉草酸ベタメタゾン、酢酸プレドニゾロン、シクロスポリン、タクロリムス、パクリタキセル、塩酸イリノテカン、シスプラチン、メサトレキセート、カルモフル、デカフル、ドキシソルビシン、クラリスロマイシン、アズトレオナム、セフニジル、ナルジクス酸、オフロキサシン、ノルフロキサシン、ケトプロフェン、フルルビプロフェン、フルルビプロフェンアキセチル、クロルプロマジン、ジアゼパム、ニフェジピン、塩酸ニカルジピン、ベシル酸アムロジピン、カンデサルタンシレキセチル、アシクロビル、ビダラビン、エファビレンツ、アルプロスタジル、ジノプロストン、ビタミンA（レチノール）、ビタミンD、ビタミンEおよびビタミンKなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0019】

上記薬物が塩、エステル、立体異性体、光学異性体、溶媒和などを有する場合はそれらの全てを包含する。

#### 【0020】

本発明が提供するナノ粒子に含有される水溶性薬物としては、2価または3価の金属イオンと結合して脂溶性化される薬物であればいずれでも良く、例えば水溶性のステロイドホルモン、免疫抑制・調節薬、抗癌薬、抗生物質、化学療法薬、抗ウイルス薬、非ステロイド性抗炎症薬、抗精神病薬、降圧薬、プロスタグランジン系薬およびビタミンから選択されるものであり、分子内にリン酸基、カルボキシル基または硫酸基を有する薬物が特に好ましい。さらに具体的にはリン酸ベタメサゾン、リン酸デキサメタゾン、リン酸プレドニゾロン、コハク酸プレドニゾロン、コハク酸ヒドロコルチゾン、バンコマイシン、ビンクリスチン、ビンプラスチン、コハク酸クロラムフェニコール、ラタモキセフ、セフピロム、カルモナム、リン酸クリンダマイシンおよびアバカビルなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0021】

上記薬物が塩、エステル、立体異性体、光学異性体、溶媒和などを有する場合はそれらの全てを包含する。

#### 【0022】

本発明の一次ナノ粒子を製造する場合において、脂溶性薬物または水溶性薬物の場合は脂溶性化する必要がある。水溶性薬物を脂溶性化する手段として最も好ましいのは、水溶性薬物と沈殿物を形成する2価または3価の金属イオンを使用することである。そのような2価または3価の金属イオンとしては、酢酸亜鉛、塩化亜鉛、硫酸亜鉛などの亜鉛塩による亜鉛イオン；炭酸カルシウム、塩化カルシウム、硫酸カルシウムなどのカルシウム塩によるカルシウムイオン；塩化鉄、硫化鉄などの鉄塩による鉄イオン；塩化銅、硫酸銅などの銅塩による銅イオン等を挙げることができ、なかでも亜鉛イオンを好ましく使用することができる。

#### 【0023】

この場合の水溶性薬物と2価または3価の金属イオンとの配合比は特に限定されず、両物質が結合することにより沈殿物を生じるに十分な比率であればよい。例えば、亜鉛イオンの場合、水溶性薬物と亜鉛塩とを重量比で10:1～1:2程度とするのがよい。その他の脂溶性化方法として、コンドロイチン硫酸ナトリウム、ヒアルロン酸、キトサンなど

の酸性または塩基性多糖体と接触させること、あるいは水溶性薬物を溶解した溶液の pH 調節、イオン強度の変化などにより行うことも可能である。なお、脂溶性薬物はそのまま使用することができる。

#### 【0024】

本発明の一次ナノ粒子を製造するためには、カルボキシル基、リン酸基、硫酸基などの陰イオン残基を持つ有機化合物が必要であり、それらを有していればいずれでもよいが、なかでもカルボキシル基を有する中長鎖有機化合物が好ましい。そのような陰イオン残基を持つ中長鎖有機化合物としては炭素数 6～24 の不飽和または飽和脂肪酸あるいはその塩が好ましく、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸などの不飽和脂肪酸；ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸などの飽和脂肪酸が挙げられ、オレイン酸、ミリスチン酸が特に好ましい。これらの中長鎖有機化合物は粉末である場合にはそのまま加えることが可能であるが、水、有機溶媒または含水有機溶媒に溶解して使用するのが好ましい。そのような有機溶媒としては、アセトン；メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールなどの低級アルコールが使用でき、なかでもアセトン、エタノールが好ましい。なお、脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物と中長鎖有機化合物との配合重量比は、1：0.5～1：0.03 程度とするのが好ましい。

#### 【0025】

本発明のナノ粒子を製造するに際しては、生成したナノ粒子同士の凝集を避けるために、適量の界面活性剤を添加するのが好ましく、その配合量はナノ粒子同士が凝集しない程度で適宜選択することができ、中長鎖有機化合物に対してモル比で 0.3～0.03 程度使用するのがよい。そのような界面活性剤としては、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレート（Tween80）、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート（Tween20）、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノステアレート（Tween60）、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノパルミテート（Tween40）、ポリオキシエチレン（20）ソルビタントリオレート（Tween85）、ポリオキシエチレン（8）オクタフルエニルエーテル、ポリオキシエチレン（20）コレステロールエステル、脂質-ポリエチレングリコール、脂肪酸-ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油などの非イオン性界面活性剤を使用することができ、なかでもポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレート（Tween80）が好ましい。

#### 【0026】

本発明のナノ粒子は、上述により得られる一次ナノ粒子を 2 価または 3 価の金属塩と作用させることにより得られる二次ナノ粒子、およびこの二次ナノ粒子を 1 価ないし 3 価の塩基性塩と作用させることにより得られる三次ナノ粒子からなる。

#### 【0027】

使用される 2 価または 3 価の金属塩としては、塩化カルシウム、酢酸カルシウム、硫酸カルシウムなどのカルシウム塩；酢酸亜鉛、塩化亜鉛、硫酸亜鉛などの亜鉛塩；塩化鉄、硫化鉄などの鉄塩；または塩化銅、硫化銅などの銅塩であり、なかでもカルシウム塩、特に塩化カルシウムが好ましい。金属塩の配合量は一概に限定し得ないが、有効成分となる薬物に対し重量比で 3～0.01 程度が好ましい。

#### 【0028】

また、三次ナノ粒子を得るための 1 価ないし 3 価の塩基性塩としては、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウムなどの炭酸水素塩；リン酸水素ナトリウム、リン酸水素カリウムなどのリン酸水素塩；炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸カルシウムなどの炭酸塩；リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、リン酸カルシウムなどのリン酸塩；シュウ酸ナトリウム、シュウ酸カリウム、シュウ酸カルシウムなどのシュウ酸塩；乳酸ナトリウム、乳酸カリウム、乳酸カルシウムなどの乳酸塩、尿酸ナトリウム、尿酸カリウム、尿酸カルシウムなどの尿酸塩などであり、なかでも脂溶性薬物の場合は炭酸水素塩、炭酸塩が好ましく、脂溶性化された水溶性薬物の場合は炭酸塩とくに炭酸ナトリウムが好ましい。塩基性塩の配合量は一概に限定し得ないが、上記 2 価または 3 価の金属塩に対しモル比で 1.0～0.05 程度であるのが好ましい。

**【0029】**

以下に、本発明が提供するナノ粒子の製造方法について説明する。

先ず、脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物と、陰イオン残基を持つ中長鎖有機化合物と界面活性剤とを有機溶媒または含水有機溶媒に溶解し、この溶液を多量の水に分散させ、この溶液を1～30分間程度攪拌することにより一次ナノ粒子が作製される。かくして作製された一次ナノ粒子を含有する溶液に、2価または3価の金属塩を加え、1～30分間攪拌して二次ナノ粒子を作製する。次いで、かくして得られた二次ナノ粒子の溶液に1価ないし3価の塩基性塩を加え、1分～24時間攪拌することにより三次ナノ粒子を得ることができる。なお、水溶性薬物を脂溶性化する方法は、水溶性薬物を酸性、塩基性または中性の水に溶解し、その溶液に2価または3価の金属イオンを加えることにより得られる。

**【0030】**

かくして製造された本発明の脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物を含有する二次ナノ粒子および三次ナノ粒子の溶液を、凍結乾燥、減圧乾燥、噴霧乾燥等を行うことにより溶媒を除去し、製剤用組成物として、適宜製剤基剤、添加剤等を使用することにより、所望の経口投与用製剤である皮膚・粘膜適用型外用剤または注射用剤を調製することができる。

**【0031】**

本発明は、また、そのような皮膚・粘膜適用型外用剤または注射用剤を提供するものである。そのような外用剤としては、全身および局所投与・治療を目的として局所へ塗布、貼付、滴下、噴霧などの形態で投与しうるものであり、具体的には、軟膏剤、ゲル剤、舌下錠、口腔錠剤、液剤、口腔・下気道用噴霧剤、吸引剤、懸濁剤、パップ剤、貼付剤等を挙げることができる。液剤としては点鼻剤、点眼剤として好ましい。また、皮膚または粘膜への塗布、下気道への噴霧などが有効な投与形態である。注射用剤としては、静脈注射、皮下注射、筋肉注射のいずれの投与形態も可能であり、それぞれの薬物の特性によって選択される。

**【0032】**

これらの外用剤、注射剤の調製に使用される基剤、その他の添加剤成分としては、製剤学的に外用剤、注射剤の調製に使用されている基剤、成分を挙げることができる。具体的には、ワセリン、プラスチックベース、パラフィン、流動パラフィン、軽質流動パラフィン、サラシミツロウ、シリコン油などの油脂性基剤；水、注射用水、エタノール、メチルエチルケトン、綿実油、オリーブ油、落花生油、ゴマ油などの溶剤；ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールなどの非イオン性界面活性剤；ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム（CMC）、キサンタンガム、トラガントガム、アラビアガム、ゼラチン、アルブミンなどの増粘剤；ジブチルヒドロキシルエンなどの安定化剤；グリセリン、1,3-ブチレングリコール、プロピレングリコール、尿素、ショ糖、エリスリトール、ソルビトールなどの保湿剤；パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸ブチル、デヒドロ酢酸ナトリウム、p-クレゾールなどの防腐剤であり、剤型に応じて適宜選択して使用することができる。また、点鼻剤の場合、ヒドロキシプロピルセルロースなどの経鼻吸収促進剤を配合すると好ましい。

**【0033】**

例えば、本発明のナノ粒子を有効成分として含有する軟膏剤の場合には、基剤等の成分としてワセリンを使用し、懸濁安定化するために0.05～0.5%のカルボキシメチルセルロースナトリウム（CMC）を一緒に使用するのがよい。

**【実施例】****【0034】**

本発明を、以下の実施例、試験例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限

定されるものではない。

### 【0035】

#### 実施例 1: 二次ナノ粒子の作製—界面活性剤の影響

10mg のオレイン酸ナトリウムを水 0.1mL に添加し、バス型超音波発生器でミセルとして完全に溶解した。その後、所定量の Tween 80 およびエタノールに溶解したエナント酸テストステロン 1mg またはシクロスポリン A 1mg を混合し、10 分間超音波照射した。次いで、所定量の塩化カルシウム水溶液を加え 30 分間攪拌することによりエナント酸テストステロンまたはシクロスポリン A を含有する二次ナノ粒子を作製した。こうしてえられた薬物含有の溶液を 10,000rpm/10 分間遠心し、その上清中のエナント酸テストステロンおよびシクロスポリン A の含有量を HPLC によって定量した。結果を表 1 および表 2 に示した。

### 【0036】

カルシウムおよび Tween 量 (重量比) がエナント酸テストステロン (TE) 含有粒子形成に及ぼす影響

### 【0037】

【表 1】

	[Ca/オレイン酸 Na]	Tween80/オレイン酸 Na (重量比)			
		0	0.2	0.5	1.0
上清中の TE 量 (%)	1	1.6	85	92	91
	3	0.5	90	93	93
	5	1.2	94	95	88

### 【0038】

カルシウムおよび Tween 量 (重量比) がシクロスポリン A (CYA) 含有粒子形成に及ぼす影響

### 【0039】

【表 2】

	[Ca/オレイン酸 Na]	Tween80/オレイン酸 Na (重量比)			
		0	0.2	0.5	1.0
上清中の CYA 量 (%)	1	1.1	49	84	65
	3	0.8	81	87	94
	5	0.8	58	65	86

### 【0040】

表 1 および表 2 に示した結果から、Tween 80 を混合しない場合には、大きな粒子や凝集体が形成され、薬物が沈殿してしまったが、2mg 以上の Tween 80 を混合することで、薬物を含有した小さな粒子が形成されていることが判明した。また、カルシウム量の変化によっては薬物の含有量は影響されなかった。

### 【0041】

#### 実施例 2: 二次ナノ粒子の作製

10mg のオレイン酸ナトリウムを水 0.1mL に添加し、バス型超音波発生器でミセルとして完全に溶解した。その後、所定量の Tween 80 およびエタノールに溶解した吉草酸ベタメサゾン 1mg を混合し、10 分間超音波照射した。次いで、1M 塩化カルシウム水溶液 33μL を添加し、30 分間攪拌することにより吉草酸ベタメサゾン含有する二次ナノ粒子を作製した。こうして得られた薬物含有の溶液を 10,000rpm/10 分間遠心し、その上清中の吉草酸ベタメサゾンの含有量を HPLC によって定量した。結果を表 3 に示した。

### 【0042】

吉草酸ベタメサゾン (BV) の粒子化

### 【0043】

【表3】

	Tween80／オレイン酸 Na (重量比)				
	0	2.0	4.0	6.0	8.0
上清中のBV量 (%)	14	89	90	91	89

【0044】

実施例3：界面活性剤と粒径の関係

10mgのオレイン酸ナトリウムに、所定量の脂質-PEG（ホスファチジルエタノールアミン-PEG（MW：2000）、日本油脂製）またはTween80を混合し、超音波照射してから、1M塩化カルシウム水溶液33 $\mu$ Lを添加しその粒径を測定した。結果を表4に示した。

【0045】

界面活性剤量が界面活性剤／オレイン酸粒子の粒径に及ぼす影響

【0046】

【表4】

	界面活性剤	界面活性剤／オレイン酸 Na (重量比)							
		0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.6	0.8	1.0
粒径 (nm)	脂質-PEG	凝集	160	123	133	151	163	196	209
	Tween80	凝集	ND	99	ND	107	126	ND	161

ND：測定せず

【0047】

表4に示した結果より、界面活性剤の量が多くなるほどその粒径が大きくなるが、少なすぎても凝集や大きな粒子が形成され、最小の粒径を形成する混合比が存在することが判明した。

【0048】

実施例4：三次ナノ粒子の作製-金属塩／塩基性塩の種類の影響

10mgのオレイン酸ナトリウムを水0.1mLに添加し、バス型超音波発生器でミセルとして完全に溶解した。その後、6mgのTween80およびエタノールに溶解したシクロスポリンA1mgを混合し、10分間超音波照射した。次いで、1M塩化カルシウムあるいは1M塩化亜鉛をオレイン酸ナトリウムに対し等モル量となるように添加し、30分間攪拌することによりシクロスポリンAを含有する二次ナノ粒子を作製した。次いで、この二次ナノ粒子を含有する溶液に金属塩と等モル量の炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウムあるいはリン酸二水素ナトリウムを添加し、1時間攪拌することにより薬物を含有する三次ナノ粒子を作製した。その後、10,000rpm／10分間遠心し、その上清中のシクロスポリンAの含有量をHPLCにより定量した。結果を表5に示した。

【0049】

種々の金属塩および塩基性塩による第二次ナノ粒子形成

【0050】

【表5】

	金属塩	塩基性塩			
		なし	NaHCO <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
		—	1M,33 $\mu$ L	1M,33 $\mu$ L	1M,33 $\mu$ L
上清中の CYA量 (%)	CaCl <sub>2</sub> (1M,33 $\mu$ L)	97	93	88	62
	ZnCl <sub>2</sub> (1M,33 $\mu$ L)	46	48	47	76

オレイン酸Na：10mg、Tween80：6mg、シクロスポリンA（CYA）：1mg

【0051】

表5に示した結果からも判明するように、塩化亜鉛を添加した場合に比較して塩化カルシウムを添加した時のほうが、小さくて安定なシクロスポリンA含有ナノ粒子が調製でき

ることが判明した。また、塩化亜鉛を添加した場合には、塩基性塩としてリン酸塩のほうが炭酸塩に比較して小さくて安定なシクロスポリンA含有ナノ粒子が調製でき、逆に、塩化カルシウムを添加した場合には、塩基性塩として炭酸塩のほうがリン酸塩に比較して小さくて安定なシクロスポリンA含有ナノ粒子が調製できることが判明した。

#### 【0052】

##### 実施例5：三次ナノ粒子の作製—塩基性塩の影響

10mgのオレイン酸ナトリウムを水0.1mLに添加し、バス型超音波発生器でミセルとして完全に溶解した。その後、5mgのTween80およびエタノールに溶解したエナント酸テストステロン1mgまたはシクロスポリンA1mgを混合し、10分間超音波照射した。次いで、塩化カルシウムをオレイン酸ナトリウムに対し3倍モル比となるように添加し、30分間攪拌することによりエナント酸テストステロンまたはシクロスポリンAを含有する二次ナノ粒子を作製した。次いで、この二次ナノ粒子を含有する溶液に所定量の炭酸水素ナトリウムを添加し、1時間攪拌することにより薬物を含有する三次ナノ粒子を作製した。その後、10,000rpm/10分間遠心し、その上清中のエナント酸テストステロンおよびシクロスポリンAの含有量をHPLCにより定量した。結果を表6および表7に示した。

#### 【0053】

炭酸水素ナトリウム量の粒子形成への影響（エナント酸テストステロン、TE）

#### 【0054】

【表6】

	[NaHCO <sub>3</sub> ]/[Ca]										
	0	0.03	0.1	0.2	0.3	0.5	0.75	1.0	2.0	3.0	5.0
上清中の TE (%)	92	88	89	86	83	82	80	73	63	56	46

#### 【0055】

炭酸水素ナトリウム量の粒子形成への影響（シクロスポリンA、CYA）

#### 【0056】

【表7】

	[NaHCO <sub>3</sub> ]/[Ca]										
	0	0.03	0.1	0.2	0.3	0.5	0.75	1.0	2.0	3.0	5.0
上清中の CYA (%)	64	71	73	55	48	67	55	46	49	61	34

#### 【0057】

表6および表7に示した結果より、カルシウムに対する炭酸水素ナトリウムの量を増加させるほど上清中の薬物の量は減少した。これは、過剰に存在する炭酸とカルシウムが反応し、炭酸カルシウムが形成され、その沈殿物と作製されたナノ粒子が共沈したためと思われる。

#### 【0058】

##### 実施例6：三次ナノ粒子の作製

実施例5において薬物をエナント酸テストステロンとし、炭酸水素ナトリウムの代わりにリン酸水素二ナトリウム（塩化カルシウムに対し0.5倍モル量）を使用した以外は実施例5と同様の操作を行うことにより、リン酸カルシウムにより被覆されたエナント酸テストステロンを含有する三次ナノ粒子を作製した。

#### 【0059】

##### 実施例7：三次ナノ粒子の作製—界面活性剤の影響—安定性

10mgのオレイン酸ナトリウムを水0.1mLに添加し、バス型超音波発生器でミセルとして完全に溶解した。その後、界面活性剤であるTween80、ポリオキシエチレンコレステリルエーテル（CS-20、日本エマルジョン製）またはPEG-オレイン酸

(日本油脂製)の所定量およびエタノールに溶解したシクロスポリンA 1mgを混合し、10分間超音波照射した。次いで、1M塩化カルシウム水溶液 33  $\mu$ L、および1M炭酸水素ナトリウム水溶液 16.5  $\mu$ Lを順次攪拌しながら添加し、その後1時間攪拌することにより、シクロスポリンAを含有する三次ナノ粒子を作製した。その後、10,000 rpm/10分間遠心し、その上清中の粒子懸濁液を水、生理食塩水、PBS、ウシ胎児血清(FBS)中に1:9の体積比で添加し、550nmでの吸収値を測定することにより、各液中における安定性を評価した。結果を表8に示した。

## 【0060】

各溶液中での粒子の分散安定性(3時間後の550nmでの濁度変化)

## 【0061】

【表8】

		Tween80/オレイン酸 Na (重量比)			
		0.2	0.4	0.6	1.0
3時間後の吸収値 (濁度変化) $\Delta Abs_{550nm}(0-3Hr)$	H <sub>2</sub> O	0.09	0.02	0.15	0.00
	生理食塩水	0.02	0.00	0.06	0.00
	PBS	0.01	0.03	0.04	0.00
	FBS	0.01	0.03	0.00	0.13
		CS-20/オレイン酸 Na (重量比)			
		0.2	0.4	0.6	1.0
3時間後の吸収値 (濁度変化) $\Delta Abs_{550nm}(0-3Hr)$	H <sub>2</sub> O	0.04	0.59	0.91	0.67
	生理食塩水	0.02	0.08	0.13	0.04
	PBS	0.02	0.04	0.06	0.03
	FBS	0.03	0.07	0.26	0.41
		PEG-オレイン酸/オレイン酸 Na (重量比)			
		0.2	0.4	0.6	1.0
3時間後の吸収値 (濁度変化) $\Delta Abs_{550nm}(0-3Hr)$	H <sub>2</sub> O	0.41	0.40	0.40	0.72
	生理食塩水	0.22	0.17	0.13	0.40
	PBS	0.06	0.20	0.16	0.26
	FBS	0.02	0.03	0.23	0.49

## 【0062】

表8に示した結果より、CS-20およびPEG-オレイン酸においてもTween80と同様にナノ粒子が調製できたが、Tween80を使用して調製された粒子が各液中で最も安定であった。

## 【0063】

また、本実施例の各調製段階における粒子の粒径を測定した。その結果を下記表9に示した。それによると、二次ナノ粒子、三次ナノ粒子ともに数十nmの粒子が得られることが判明した。

## 【0064】

粒子径の変化

## 【0065】

【表9】

	オレイン酸 Na + Tween80	Tween80 + CaCl <sub>2</sub>	Tween80 + CaCl <sub>2</sub> + NaHCO <sub>3</sub>
粒子径 (nm)	ND	80	90

ND: 測定せず

## 【0066】

実施例8: 三次ナノ粒子の作製—マウス経皮吸収試験

10mg オレイン酸ナトリウム、シクロスポリンA 1mg、Tween80 4mg、



1 M塩化カルシウム水溶液 33  $\mu$ L および 1 M炭酸水素ナトリウム水溶液 16.5  $\mu$ L を用いて、実施例 5 と同様の操作を行ってシクロスポリン A 含有の三次ナノ粒子を作製した。こうして得られたナノ粒子を含有する溶液を 3500 rpm で遠心することにより炭酸カルシウム沈殿を除去し、上清を Centriprep (YM-50、アミコン製) で濃縮して、シクロスポリン A 含有の三次ナノ粒子を得た。

#### 【0067】

この粒子中のシクロスポリン A 量を HPLC により定量し、7 週齢雌 ddy マウスの脱毛した背中皮膚にシクロスポリン A 量として 2 mg/匹となるように粒子懸濁液 (25%グリセリン水溶液) を塗布した。また、同量の粒子の水懸濁液 (グリセリンなし) を皮下注射投与した。対照例として、同量のシクロスポリン A (25%グリセリン/50%エタノール水溶液) を塗布し、投与後 1、3、24 時間後に全採血を行い、FPIA 法により血漿中に含まれるシクロスポリン A を定量した。結果を表 10 に示した。

#### 【0068】

マウス皮膚へのシクロスポリン A (CYA) 封入粒子を塗布した後の血中 CYA 濃度の推移

#### 【0069】

【表 10】

	血中 CYA 濃度 (ng/mL)		
	1 時間後	3 時間後	24 時間後
経皮投与 (CYA 封入粒子)	479	2520	1160
皮下投与 (CYA 封入粒子)	2725	3240	2450
経皮投与 (対照: CYA のみ)	88	1745	457

#### 【0070】

表 10 に示した結果から判るように、本発明のナノ粒子を塗布した場合は、シクロスポリン A のみを塗布した場合に比べ、高い血中濃度を示すと同時に徐放性を示し、粒子化することでシクロスポリン A が経皮吸収されやすくなっている。また、本発明のナノ粒子を皮下注射投与した場合でも、24 時間後でも高い血中濃度が維持されており、吸収性、徐放性に優れていた。

#### 【0071】

#### 実施例 9: 三次ナノ粒子の作製—界面活性剤、脂肪酸、溶媒の使用量の影響

所定量のアセトン中に、エナント酸テストステロン 10 mg、所定量のミリスチン酸および Tween 80 を溶解し、その溶液を水中に添加、攪拌することによりエナント酸テストステロン含有の一次粒子を得た。この粒子懸濁液中に 1 M塩化カルシウム水溶液 (ミリスチン酸に対し等モル量) を添加し 30 分攪拌して二次粒子を作製した。次いで、この溶液中へ 1 M炭酸水素ナトリウム (カルシウムに対し 0.2 倍モル量) を添加し 1~12 時間攪拌した。Tween 80 量、ミリスチン酸量、アセトン量を適宜変えながら調製して得た三次ナノ粒子含有溶液を 10,000 rpm で 10 分間遠心し、上清中に含まれる粒子の粒径、エナント酸テストステロンの量を測定した。結果を表 11~13 に示した。

#### 【0072】

Tween 量が粒子形成に及ぼす影響

#### 【0073】

【表 11】

	Tween80/TE (重量比)				
	0	0.2	0.4	0.6	1.0
上清中の TE 量 (%)	2	73	96	92	103
粒径 (nm)	凝集	273	231	209	229

エナント酸テストステロン (TE): 10 mg、ミリスチン酸: 0.5 mg、アセトン: 360  $\mu$ L

【0074】

ミリスチン酸量が粒子形成に及ぼす影響

【0075】

【表12】

	ミリスチン酸/TE (重量比)				
	0	0.05	0.1	0.2	0.4
上清中のTE量 (%)	42	72	79	64	50
粒径 (nm)	凝集	231	265	279	268

エナント酸テストステロン (TE) : 10mg、Tween80 : 0.5mg、アセトン : 3270  $\mu$ L

【0076】

アセトン量が粒子形成に及ぼす影響

【0077】

【表13】

	アセトン量 ( $\mu$ L)			
	125	250	500	1000
上清中のTE量 (%)	72	85	82	82
粒径 (nm)	210	170	130	130

エナント酸テストステロン (TE) : 5mg、ミリスチン酸 : 0.5mg、Tween80 : 2mg

【0078】

表11~13に示した結果より、Tween80と薬物との混合比、ミリスチン酸と薬物との混合比およびアセトンの使用量が、粒子の形成(粒径、エナント酸テストステロンの含有量)に大きく影響を及ぼすことが判明した。また、Tween80の量が多いほどエナント酸テストステロンの含有量が増加し、ミリスチン酸の量が多いほどエナント酸テストステロンの含有量が減少し、アセトンの使用量が多いほど粒径が小さくなることが判明した。

【0079】

実施例10: 水溶性薬物(リン酸ベタメサゾン)の三次ナノ粒子の作製

リン酸ベタメサゾン10mgを溶解した500  $\mu$ Lの水中に、0.5M酢酸亜鉛水溶液1000  $\mu$ Lを添加した。12,000rpm/5分間遠心し、上清を除去後、沈殿に水を添加し遠心することで沈殿を洗浄した。この沈殿と1mgのミリスチン酸及びTween80をアセトン1000  $\mu$ L中に溶解(または懸濁)し、水中に添加攪拌することで、一次ナノ粒子を得た。この粒子懸濁液中に1M塩化カルシウム水溶液(ミリスチン酸に対し等モル量)を添加し30分攪拌後、1M炭酸水素ナトリウム(カルシウムに対し0.2倍モル量)を添加し1時間~12時間攪拌し、リン酸ベタメサゾンを含む三次ナノ粒子を作製した。Tween80の量を変え調製し、5,000rpmで5分間遠心後、上清の粒子の粒径、およびリン酸ベタメサゾン(BP)残量をHPLCにより測定した。その結果を表14に示した。

【0080】

Tween量が粒子形成に及ぼす影響

【0081】

【表14】

	Tween80/BP (重量比)				
	0	0.2	0.4	0.6	1.0
上清中のBP量 (%)	20	77	83	78	88
粒径 (nm)	ND	315	293	225	165

リン酸ベタメサゾン (BP) : 10 mg、ミリスチン酸 : 1 mg、アセトン : 1000  $\mu$ L

ND : 測定せず

【0082】

表14に示した結果から、Tween 80を混合しないで調製した場合には、凝集塊が形成され上清中にBPはほとんど検出されなかった。Tween 80量を混合させることで分散安定性の高い粒子が調製され、その量を多くするほど小さな粒子が調製できることがわかった。

【0083】

実施例 11 : 軟膏剤 / ハイドロゲル剤の製造

実施例5で得られた三次ナノ粒子 (エナント酸テストステロン封入)、白色ワセリン、カルボキシメチルセルロースナトリウムおよびパラオキシ安息香酸メチルの適量を取り、全量が均質になるまで混和し、軟膏剤およびハイドロゲル剤とした。

【0084】

実施例 12 : 外用貼付剤 (水性パップ剤)

処方:

実施例5で得られた三次ナノ粒子 (エナント酸テストステロン封入)	0.1 重量部
ポリアクリル酸	2.0 重量部
ポリアクリル酸ナトリウム	5.0 重量部
カルボキシメチルセルロースナトリウム	2.0 重量部
ゼラチン	2.0 重量部
ポリビニルアルコール	0.5 重量部
グリセリン	25.0 重量部
カオリン	1.0 重量部
水酸化アルミニウム	0.6 重量部
酒石酸	0.4 重量部
EDTA-2-ナトリウム	0.1 重量部
精製水	残部

上記配合成分をベースとし、常法により外用剤 (水性パップ剤) を得た。

【0085】

実施例 12 : 注射剤

実施例5で得られた三次ナノ粒子 (シクロスポリンA封入) を注射用蒸留水に溶解し、等張化剤を含有させ、さらにpHを6.9に調整した後、バイアル充填し、高温高圧滅菌を行い、注射剤を得た。

【産業上の利用可能性】

【0086】

以上のように、本発明は、脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物を含有する一次ナノ粒子を2価または3価の金属塩を作用させることから成る薬物含有ナノ粒子 (二次ナノ粒子)、および脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物を含有する一次ナノ粒子を2価または3価の金属塩と作用させることにより二次ナノ粒子とし、当該二次ナノ粒子に1価ないし3価の塩基性塩を作用させることから成る薬物含有ナノ粒子 (三次ナノ粒子)、ならびにそれらのナノ粒子の製造方法、さらにそれらのナノ粒子を含有する皮膚または粘膜適用型外用剤および注射剤である。本発明のナノ粒子は、これまで十分に達成されていなかった脂溶性薬物、水溶性薬物の経皮または経粘膜による生体内吸収を可能にする画期的な効果を有し、高吸収性、徐放性の脂溶性・水溶性薬物を含有する外用剤、注射剤である。

**【書類名】 要約書****【要約】****【課題】**

これまで十分に達成されていなかった脂溶性薬物、水溶性薬物の経皮または経粘膜による生体内吸収を可能にする効果を有し、高吸収性の脂溶性・水溶性薬物を含む外用剤、注射剤を提供することであり、注射剤は特に徐放やターゲット効果を目的とする。

**【解決手段】**

脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物を含む一次ナノ粒子を、2 価または 3 価の金属塩を作用させることからなる薬物含有ナノ粒子（二次ナノ粒子）、および脂溶性薬物または脂溶性化された水溶性薬物を含む一次ナノ粒子を 2 価または 3 価の金属塩と作用させることにより二次ナノ粒子とし、当該二次ナノ粒子に 1 価ないし 3 価の塩基性塩を作用させることから成なる薬物含有ナノ粒子（三次ナノ粒子）、ならびにそれらのナノ粒子の製造方法、さらにそれらのナノ粒子を含む皮膚または粘膜適用型外用剤および注射剤である。

**【選択図】**

なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 4 2 8 4 6 2
受付番号	5 0 3 0 2 1 2 4 7 3 6
書類名	特許願
担当官	第三担当上席 0 0 9 2
作成日	平成 1 5 年 1 2 月 2 5 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成15年12月24日
-------	-------------

特願 2 0 0 3 - 4 2 8 4 6 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 0 3 0 1 0 4 5 2 ]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 2 月 2 5 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都港区愛宕 2 丁目 5 番 1 号

氏 名

株式会社 L T T バイオフィーマ